第 40 卷 第 2 期　　昆 虫 学 报　　Vol. 40, No. 2
1997 年 5 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　May, 1997

测定节肢动物捕食者与猎物关系的 A 蛋白双抗体夹心酶联免疫吸附技术*

刘红玉　　陈常铭　　江汉华
（湖南农业大学植保系　长沙　410128）

酶联免疫吸附技术（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）是70年代才发展起来的血清学技术，目前在昆虫生态学和生物防治研究中有大量的研究报道[1~8]，研究发现其灵敏度和特异性都远远高于其它血清学方法，如毛细管环状沉淀法（capillary ring test，CRI），凝胶双扩散法（double diffusion test，DDT）和对流免疫电泳（cross-over immuno-electrophoresis，COIEP），而且检测速度快，适于田间大规模检测。ELISA 主要有直接法（direct method）、间接法（indirect method）、双抗体夹心法（double antibody sandwich method）和 A 蛋白双抗体夹心法（protein A double antibody sandwich method），其中 A 蛋白双抗体夹心法在昆虫学研究中尚未见报道。

本项研究以检测茶园捕食性天敌对茶二岔蚜 *Toxoptera aurantii*（Boyer）、茶尺蠖 *Ectropis obliqua*（Warren）的捕食作用，探讨 A 蛋白双抗体夹心酶联免疫吸附法（PAS-ELISA）中各参数的最适宜条件，并从灵敏度及特异性方面与 DDT，COIEP，I-ELISA 法进行比较。

1　材料与方法

1.1　供试虫源

茶二岔蚜无翅成虫、茶尺蠖幼虫、捕食性天敌，均采自湖南农大茶场。

1.2　试剂

A 蛋白纯品、辣根过氧化物酶联 A 蛋白从上海生化所购买。其中 A 蛋白是从一些金黄色葡萄球菌细胞壁上提取的一种蛋白成分，能与人及多种哺乳动物血清 IgG 分子的 Fc 段非特异性结合，抗体分子的 Fab 部位仍保持免疫活性。利用 A 蛋白的这种特性，将它作为载体参与反应。

1.3　抗原的制备

将采集的茶二岔蚜、茶尺蠖在室温下饥饿24 h 后，分别用蒸馏水洗净，加等体积生理盐水磨成匀浆，用过量磷酸缓冲液（pH 7.2）于4 ℃下抽提，离心（3 500 r/min）15 min，取上清液经二层镜头纸、普通滤纸、细菌过滤器（Φ0.22 μ）过滤，滤液于 PBS 缓冲液中4 ℃下透析2 d，再用过饱和蔗糖溶液浓缩，在721分光光度计下测其蛋白质含量，测得茶二岔蚜为5 mg/mL、茶尺蠖为5.3 mg/mL。分装于灭过菌的安培瓶中，冰冻保存作为抗原。

1.4　抗血清的制备

参考 Miller[6]，免疫剂量从1.25 mg/只，逐渐递增至3.5 mg/只，依次采用多点皮下、肌肉、静脉

* 国家自然科学基金资助项目
1995-01-03收稿，1995-03-15收修改稿

注射三种免疫途径，经63 d免疫，采血抽提抗血清，测得效价为1.02×10^6（I-ELISA法）。

1.5 捕食性天敌的处理

将采集的天敌狼蛛 *Lycosa* sp.、跳蛛 *Bianor* sp.、猫蛛 *Oxyopes* sp.、臭步甲 *Pheropsophus* sp.、龟纹瓢虫 *Propylea japonica*（Thunberg）和步甲 *Calosoma* sp.，每一种的一部分饥饿致死，取其消化道将内容物涂布于硝酸纤维素膜（NC膜）上，冰冻干燥保存，作为阴性对照；另一部分取其消化道内容物涂于NC膜上，冰冻干燥保存，作检测用。检测时，将NC膜剪碎，用300 μL磷酸盐缓冲液（pH 7.4，0.02 mol/L）浸提，4 ℃下过夜，次日摇匀，静置数分钟，取上清液检测。

1.6 血清学方法

共采用了4种血清学方法：凝胶双扩散法[9]、间接酶联免疫吸附法[3]，对流免疫电泳[6]和A蛋白双抗体夹心酶联免疫吸附法。PAS-ELISA的测试程序如下：

（1）将A蛋白纯品用碳酸盐缓冲液（pH 9.6，0.1 mol/L）稀释，包被40孔酶联板，100 μL/孔，4 ℃下过夜，次日用磷酸盐缓冲液（pH 7.4，0.02 mol/L）洗板3次。（2）加第一抗血清（用含0.2 %牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液稀释，100 μL/孔，37 ℃水浴2 h，洗板3次。（3）加抗原或天敌消化道内容物抽提液，100 μL/孔，37 ℃水浴2 h，洗板3次。（4）加第二抗血清，同（2）。（5）加辣根过氧化物酶联A蛋白（HRP-Protein A）用含0.2 %牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液稀释，100 μL/孔，37 ℃水浴2 h，洗板3次。（6）加底物溶液（邻苯二胺4 mg，柠檬酸-磷酸盐缓冲液10 mL，H_2O_2 15 μL），100 μL/孔，37 ℃水浴30 min。（7）加2 mol/L H_2SO_4，25 μL/孔，终止反应，2 min后在酶联仪上492 nm处测OD值，求出阴性对照OD值的平均值$\overline{N}$，若样品OD值$P\geqslant2\overline{N}$，则视为阳性反应，否则为阴性反应。

2 结果与分析

2.1 A蛋白最适包被浓度的测定

将A蛋白纯品稀释成2.5、2.0、1.5、1.0 μg/mL，分别与倍比稀释的茶二岔蚜抗原反应，第一、二抗体分别用5 000、1 000倍释的抗血清，用正常血清和缓冲液作阴性对照进行PAS-ELISA试验。结果（图1）显示：A蛋白包被浓度在1.5～2.5 μg/mL范围内，均能取得较满意的结果。其中以B线的2 μg/mL浓度最好，因为反应的OD值随抗原浓度变化的曲线陡度最大，阳性、阴性OD值的比值大，使判断结果更准确。

2.2 第一、第二抗体最适工作浓度的选择

将茶二岔蚜抗血清稀释成10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}和10^{-5}浓度作为第一抗体，该抗血清稀释作第二抗体，A蛋白2 μg/mL包被酶联板，茶二岔蚜抗原10 μg/mL，正常血清2 000倍稀释作为阴性对照，进行PAS-ELISA试验。结果（图2）显示：第一抗体稀释成10^{-2}～10^{-4}都可以，但以10^{-4}最合适，因此时曲线陡度最大，本底值最低，非特异性反应最弱。当第一抗体浓度为10^{-4}时，第二抗体浓度以10^{-3}为好。此浓度下OD值较高，为1.10左右，浓度再升高10倍，OD值上升不多，而浓度降低10倍时，OD值下降幅度较大，因此第一、二抗体分别以10^{-4}、10^{-3}较好。

2.3 灵敏度及特异性测定

用A蛋白2 μg/mL包被酶联板，第一、二抗体为10^{-4}、10^{-3}倍稀释的茶二岔蚜抗血清，茶二岔蚜、茶尺蠖抗原分别作倍比稀释后进行PAS-ELISA试验，以缓冲液作阴性对照，结果见图3。从图中可以看出呈阳性反应的抗原最大稀释倍数为10^{-5}，此时抗原的浓度，也即PAS-ELISA的灵敏度为：500 μg/mL

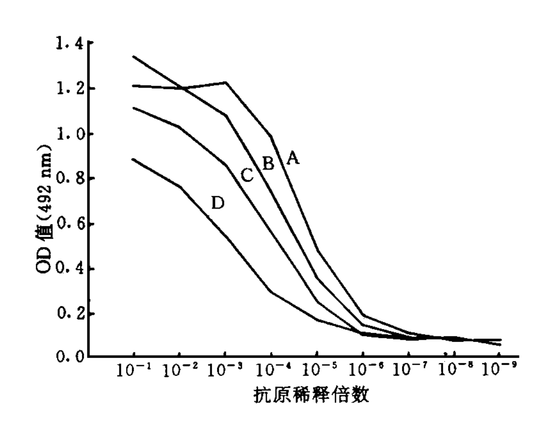


图1 不同 A 蛋白包被浓度对 OD 值的影响
A、B、C、D 分别示 A 蛋白包被浓度为
2.5、2.0、1.5、1.0 μg/mL

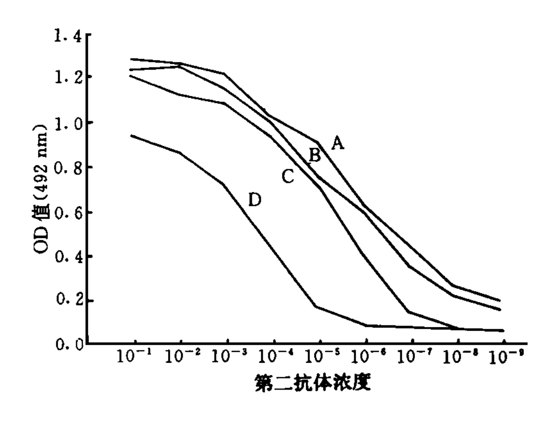


图2 第一抗体 OD 值随第二抗体浓度变化的曲线
A、B、C、D 分别示第一抗体浓度为
10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}和10^{-5}

$\times 10^{-5}=0.05$ μg/mL。茶尺蠖抗原与茶二岔蚜抗血清反应的 OD 值在阳性反应标准线以下，说明茶二岔蚜抗血清未与茶尺蠖抗原发生交叉反应。作者还将茶二岔蚜抗血清与黑刺粉虱 *Aleurocanthus spiniferus* (Quaint) 抗原，饥饿致死的天敌消化道内容物进行 PAS-ELISA 试验，结果都为阴性反应，且本底值低，为0.113左右，由此可见 PAS-ELISA 特异性好。

2.4 四种血清学方法比较

在进行 PAS-ELISA 法测定的同时，用茶二岔蚜同一抗血清对其它三种血清学方法 DDT、COIEP 和 I-ELISA 进行了最适工作条件、灵敏度及特异性测定。

(1) DDT 结果（表1）显示：抗血清稀释40～80倍，抗原稀释5～10倍时，反应最强，沉淀带最清晰。当抗血清稀释80倍，能出现可见沉淀带的抗原最高稀释倍数为80，此时抗原的蛋白质浓度为：5 000/80＝62.5 (μg/mL)（标准抗原浓度为5 mg/mL），即 DDT 灵敏度为62.5 μg/mL。对 DDT 的特异性试验表明：茶二岔蚜抗血清与黑刺粉虱、茶尺蠖及跳蛛阴性样本均有不同程度的交叉反应。

表1 茶二岔蚜抗原与其抗血清的 DDT 试验结果

抗原稀释倍数	抗血清稀释倍数							
	20	40	80	160	320	640	1 280	2 560
1	++	+++	+++	+++	++	+	+	−
5	+++	+++	+++	+++	++	+	+	−
10	+++	+++	+++	++	++	+	+	−
20	++	++	++	+	+	+	−	−
40	+	+	+	+	−	−	−	−
80	+	+	+	−	−	−	−	−
160	−	−	−	−	−	−	−	−

+++ 沉淀弧粗，反应强；+ 沉淀弧细，反应弱；++ 沉淀弧较粗，反应较强；− 无沉淀弧出现

(2) COIEP 试验结果（图4）表明：在 pH 8.6，离子强度0.05的硼酸缓冲液中电泳，抗原带负电荷，移向正极，抗体带正电荷，移向负极，在抗原、抗体孔间适宜的位置形成非常清晰的沉淀带，抗血清可不经稀释直接使用。呈阳性反应的茶二岔蚜抗原最大稀释倍数为128倍，此时抗原浓度（即灵敏度）为：

5 000/128=39 (μg/mL)。特异性试验显示：茶二岔蚜抗血清与高浓度的黑刺粉虱抗原呈阳性反应，该抗原经适当稀释约为300 μg/mL 时转为阴性反应，与蜘蛛阴性样本反应时，未出现可见沉淀带。

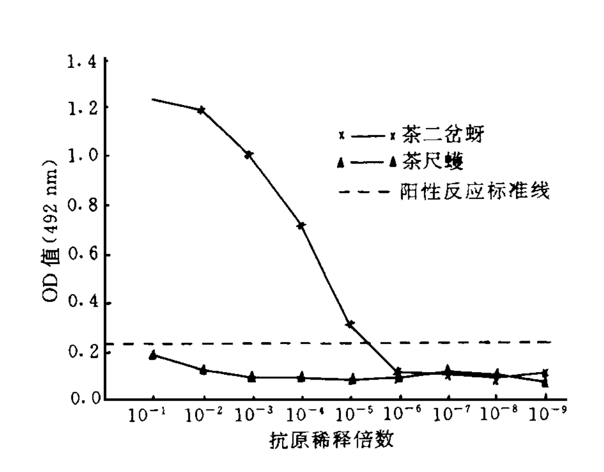


图3 茶二岔蚜、茶尺蠖抗原系列稀释与茶二岔蚜抗体反应的OD值曲线

图4 对流免疫电泳测定结果图
Ag 抗原；Ab 抗体

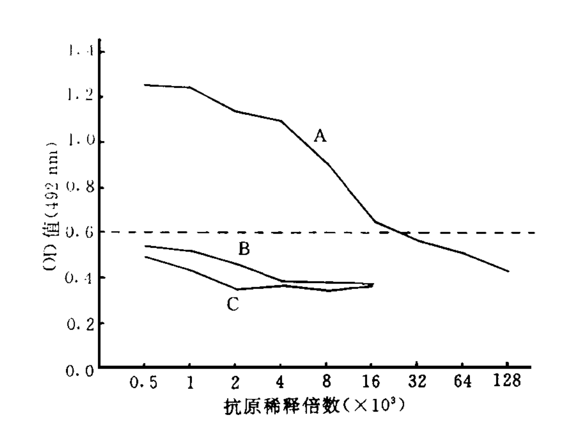


图5 三种抗原与茶二岔蚜抗血清反应OD值曲线
A、B、C分别示茶二岔蚜、黑刺粉虱、茶尺蠖抗原；虚线为阳性反应标准线

(3) I-ELISA 法最适工作条件为：抗原包被浓度10 μg/mL，抗血清8 000倍稀释，能检测的最低抗原浓度为0.3125 μg/mL。特异性检验中，茶二岔蚜抗血清虽未与黑刺粉虱、茶尺蠖抗原呈阳性反应，但OD值已十分接近阳性标准值0.600(以 $P \geqslant 1.5\overline{N}$ 为阳性标准)，本底值高，为0.404左右(图5)，抗血清经提纯去杂质，可降低本底值，减少非特异性反应。

综上所述，从灵敏度、特异性及检测速度来看，PAS-ELISA 最好，其次是 I-ELISA 和 COIEP，DDT 最差。COIEP、DDT 简单，不需要特殊的仪器设备，但一次检测的样品数有限，重复性也不太好。PAS-ELISA 和 I-ELISA 一次能检测几十个样品，重复性好，适于田间大规模检测，且 PAS-ELISA 本底值低，非特异性反应弱，因此，PAS-ELISA 是一种很有发展潜力的好方法。

2.5 茶二岔蚜、茶尺蠖的捕食性天敌检测

将天敌消化道内容物浸提液分别与茶二岔蚜、茶尺蠖抗血清进行单头测试，结果表2显示：所检测的天敌对茶二岔蚜、茶尺蠖都有捕食作用，但捕食率不一样，茶尺蠖的阳性率明显高于茶二岔蚜，这可能与猎物密度有关。根据种群密度随季节的消长关系，茶二岔蚜为前期高峰型，种群密度仅在春季出现高峰，以后急剧下降，因此到采集天敌样本(9月上旬至11月中旬)时，茶二岔蚜数量少，天敌捕食作用低，阳性率低。茶尺蠖属阶梯上升型，种群密度逐渐增大，采样时达高峰，天敌容易搜寻，故阳性率也高。室内饲养实验证实：天敌对茶二岔蚜、茶尺

蠖都有捕食作用。说明 PAS-ELISA 法可行。

表2　天敌对茶二岔蚜、茶尺蠖的 PAS-ELISA 阳性率

天敌种类	检测头数	茶二岔蚜		茶尺蠖	
		阳性数	阳性率	阳性数	阳性率
狼　蛛	15	1	0.067	7	0.467
跳　蛛	28	10	0.357	14	0.500
猫　蛛	30	4	0.133	10	0.333
臭步甲	6	3	0.500	4	0.667
龟纹瓢虫	7	5	0.714	5	0.714
步　甲	9	2	0.222	1	0.111

3　小结讨论

在害虫的综合防治上，酶联法的探讨是一较活跃的领域。Service Voller 与 Bidwell，Crook 与 Payne 对直接法、间接法和双抗体夹心法进行了比较研究，发现这三种方法中，间接法的灵敏度较高而双抗体夹心法的特异性较好[8,10]。从作者的研究结果中发现：PAS-ELISA 综合了二者优点，即较高的灵敏度和较好的特异性，又省去了双抗体夹心法中制备特异性酶联抗体（同种动物双抗体夹心法）或制备多种动物抗血清（异种动物双抗体夹心法）的麻烦，使试验简化，具有更广泛的实用价值。

在天敌对害虫捕食作用的定量评价方面，Dempstre[11]，Boreham[12]，周汉辉[9]、汤鉴球[13]、张文庆[14]等曾作过报 道，本文未能涉及，有待进一步探讨。

参　考　文　献

1　黄葵等. 应用酶联免疫吸附法鉴定粘虫的捕食性天敌. 植物保护学报，1992，**3**：207～211

2　Boreham P F L. Recent developments in serological methods for predtor-prey studies. Entomological Society of America Miscellaneous Publication，1979，**11**：17～23

3　Fichter B L，Stephen W P. Selection and use of hostspecific antigens. Entomologycal Society of America Miscellaneous Publication，1979，**4**：25～33

4　Greenstone M H. An enzyme-linked immunosorbent assay for the *Amboyospora* sp. of *Culex salinarius* (Microspora：Amblyosporidae). Journal of Invertebrate Pathology，1983，**41**：250～255

5　Miller M C. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay of narrow-and broad-spectrum anti-adult southern pine beetle serum. Annals of the Entomological Society of America，1981，**74**：279～282

6　Miller M C，Chappell W A *et al*. Evaluation of immunoelectrophoretic tests using a broad spectrum anti-adult southern pine beetle serum. Ann. Entomol. Soc. Am.，1979，**72**：99～104

7　Schoof D D *et al*. Evaluation of predator-pery relationships using an enzyme immunoassay，Ann. Entomol. Soc. Am.，1986，**79**：91～95

8　Service M W *et al*. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for the identification of bloodmeals of heamatophagous insects. Bulletin of Entomological Research，1986，**76**：321～330

9　周汉辉. 天敌对三化螟的捕食功能的血清法评价. 植物保护学报，1992，**3**：193～197

10　Crook N E，Payne C C. Comparison of three methods of ELISA for baculoviruses. Journal of General Virology. 1980，**46**：29～37

11　Dempster J P. A quantitative study of the predators on the eggs and larvae of the broom beetle，Phytodecta olivacea

Forster, using the precipitin test. J. Anim. Ecol., 1960, **29**: 149～167

12 Boreham P F L, Ohiagu C E. The use of serology in evaluating invertebrate prey-predator relationships: a review. Bull. Ent Res., 1978, **68**: 171～194

13 汤鉴球，张文庆. 用血清学方法评价稻田狼蛛对稻纵卷叶螟的控制作用. 植物保护学报，1992，**1**：1～5

14 张文庆等. 天敌作用定量评价的一种方法，青年生态学者论丛（二），1992

PROTEIN A DOUBLE ANTIBODY SANDWICH ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (PAS-ELISA) FOR IDENTIFYING THE RELATIONSHIP BETWEEN ARTHROPOD PREDATOR AND PREY

Liu Hongyu Chen Changming Jiang Hanhua

(*Department of Plant Protection, Hunan Agricultural University Changsha* 410128)